

Advies betreffende: **Clinical application of genetically modified organisms
VNP20009 and TAPET-CD**

Kennisgever: **Academisch Ziekenhuis Maastricht**

COGEM kenmerk
CGM/011228-01

BGGO nummer
BGGO 01/10

Datum advies
2 januari 2002

Advies

De COGEM kan instemmen met de verlening van een vergunning op aanvraag BGGO 01/10. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat de kans op verspreiding in het milieu van de twee te gebruiken *Salmonella typhimurium* stammen VNP20009 en TAPET-CD, zeer klein is. Daarnaast is de kans op een mogelijk negatief effect na infectie met deze stammen bij derden vrijwel uitgesloten. De COGEM acht het wenselijk dat de studie wordt uitgevoerd volgens het door de aanvrager ingediende klinisch protocol #CLI-022, waarbij met name moet worden vastgehouden aan de in het protocol beschreven inclusie en exclusievoorwaarden.

Overwegingen

Het betreft een fase I studie waarbij patiënten zullen worden behandeld met geattenueerde *S. typhimurium* stammen, als specifiek anti-tumor agens. Na toediening kan de bacterie de tumor direct, of via de bloedbaan bereiken. De bacteriestammen zijn vervolgens in staat tumoren te necrotiseren. De bacteriestammen dragen mutaties waardoor de kans op het optreden van een septische shock, die normaliter optreedt wanneer *S. typhimurium* in de bloedbaan komt, verminderd wordt.

Er worden twee stammen van *S. typhimurium* toegepast: VNP20009 en TAPET-CD. VNP20009 is een geattenueerde stam die is gegenereerd door deletie van respectievelijk het *msbB* en *purl* gen. Deletie van het *msbB* gen resulteert in een verlaagd toxiciteitsprofiel van de bacterie door een mutatie in het lipide A. Deze mutatie verlaagt inductie door lipopolysaccharide van de tumor necrose factor in humane monocyten en in muizen, in vergelijking met het niet-gemuteerde lipopolysaccharide. Daardoor wordt de kans op het optreden van een septische shock gereduceerd. Deletie van het *purl* gen maakt dat de bacterie afhankelijk wordt van een exogene bron van adenine voor de groei.

TAPET-CD is afgeleid van VNP20009. De biologische eigenschappen en het farmacologisch profiel van TAPET-CD zijn identiek aan die van VNP20009. In TAPET-CD is door middel van genetische modificatie het cytosine deaminase gen uit *E. coli* in het chromosoom gebracht. Ten gevolge van de aanwezigheid van dit gen is de bacterie in staat 5-fluorocytosine (5-FC) om te zetten naar 5-fluorouracil (5-FU). 5-FU is een

veelgebruikt anti-tumor middel, dat echter ook in aanzienlijke mate toxisch is voor niet-tumorcellen. 5-FC, dat in de handel is als anti-schimmel middel, is daarentegen veel minder toxisch. In deze studie wordt het 5-FC systemisch aan de patiënt toegediend. Op die plaatsen waar de bacterie actief is wordt door de activiteit van het cytosine deaminase gen 5-FC omgezet in 5-FU. Aangezien TAPET-CD na toediening met name in tumorweefsel aanwezig is, zal de vorming van 5-FU ook met name daar plaatsvinden.

De risico-analyse spitst zich toe op de gevolgen die kunnen voortkomen uit een mogelijke verspreiding in het milieu van VNP20009 of TAPET-CD en een eventuele infectie met VNP20009 (of TAPET-CD) bij mensen in de omgeving van de patiënt. Die verspreiding kan plaatsvinden als de bacteriestam vrijkomt uit de patiënt ('shedding' van bacteriën).

De stammen VNP20009 en TAPET-CD worden intratumoraal of intraveneus toegediend aan patiënten met tumoren. Ook bij intratumorale toediening blijken de bacteriën de bloedbaan te bereiken, zodat ook op deze wijze tumoren worden bereikt op andere plaatsen in het lichaam dan op de plaats waar toediening heeft plaatsgevonden. De stammen kunnen prolifereren in tumoren en kunnen daar tot enkele weken na toediening aanwezig blijven. In proefdierstudies met apen wordt VNP20009 na intraveneuze toediening van een enkele dosis (108 of 109 cfu/kg) na een week nog in lage concentraties aangetoond in zowel de lever als milt. In de milt kon de stam 31 dagen na toediening nog worden aangetoond. Onderzoek bij muizen heeft aangetoond dat na intratumorale injectie in muizen, VNP20009 2 weken na toediening nog aantoonbaar is in de lever. Na 7 tot 14 dagen vindt ook accumulatie van VNP20009 plaats in distale (niet-geïnoculeerde) tumoren. De stam wordt op dat moment niet in het bloed aangetoond. Op basis van deze gegevens wordt aangenomen dat het, gezien de wijze van toediening en het lot van de bacteriën na toediening, niet erg waarschijnlijk is dat er bacteriën vrijkomen uit de patiënt door "shedding". De aanvrager verstrekt experimentele gegevens afkomstig van klinisch onderzoek in het buitenland waaruit blijkt dat na intraveneuze toediening van VNP20009 bij mensen geen shedding kan worden aangetoond in feces en urine. Ook in verschillende diermodellen (apen, honden, katten) wordt geen shedding waargenomen. Shedding is daarbij vastgesteld aan de hand van groei van *S. typhimurium* op een semi-selectief medium. Hierbij geldt voor urinemonsters een detectielimiet van 10 cfu/ml en voor fecesmonsters een detectielimiet van 1000 cfu/g. Dit houdt in dat mogelijke shedding via feces kan plaatsvinden waarbij de concentratie 103 cfu per gram feces kan bedragen. Deze methode wordt, met dezelfde gevoeligheid, ook gebruikt om bij de mens de aanwezigheid van pathogene *S. typhimurium* vast te stellen. Tegen deze achtergrond, en gezien de biologische eigenschappen van de te gebruiken stammen, acht de COGEM de gebruikte methode voldoende gevoelig.

De te gebruiken stammen VNP20009 en TAPET-CD bezitten een deletie van het purI gen. Hierdoor kunnen de stammen niet groeien zonder een exogene bron van adenine. De aanvrager geeft aan dat de benodigde concentratie aan adenine voor groei van beide stammen 200 µM bedraagt (50 µg /ml). Het is echter niet duidelijk hoeveel adenine aanwezig is in de niche van *S. typhimurium*, de darm; de aanvrager levert hieromtrent geen gegevens. Het is echter zeer onwaarschijnlijk dat dergelijke concentraties in het milieu voorkomen. Hierdoor zullen de stammen zich niet in het milieu kunnen handhaven. Het ingebrachte cytosine deaminase gen in TAPET-CD is niet geassocieerd met de groeiafhankelijkheid voor een exogene purinebron en heeft daarom op geen

enkele wijze invloed op de groei van de bacterie De kans op verspreiding van de bacterie in het milieu is daarmee voldoende beperkt.

VNP20009 en TAPET-CD worden toegediend op dag 1 en 3 van elke cyclus van 28 dagen. De bij de patiënten op dag 1 toe te dienen dosis bedraagt 1×10^8 cfu/m². Afhankelijk van het optreden van toxiciteitsverschijnselen als gevolg van de initieel toegediende dosis, zal de toe te dienen dosis kunnen worden verhoogd, tot maximaal 3×10^9 cfu/m² op dag 3. Experimenteel is aangetoond dat VNP20009 en TAPET-CD t.g.v. van de eerder genoemde aangebrachte mutaties, na intraveneuze toediening ten aanzien van de pathogeniteit of toxiciteit sterk zijn geattenuerd in vergelijking met wild-type Salmonella. Wild-type *S. typhimurium* is een pathogeen van klasse 2. De aanvrager suggereert dat bij orale inname (via gecontamineerd water of voedsel) van VNP20009 of TAPET-CD de attenuering nog hoger zal zijn. Deze aanname wordt echter niet experimenteel onderbouwd. Bij mensen zijn reversibele toxiciteitsverschijnselen waar te nemen bij intraveneus toegediende doses van VNP20009 die minimaal 3×10^8 cfu/m² bedragen. Het is echter uitgesloten dat de voor de toepassing te gebruiken Salmonella stammen in dergelijke hoge concentraties in het milieu zullen voorkomen. Het ingebrachte cytosine deaminase gen in TAPET-CD is niet geassocieerd met bacteriële virulentie, toxiciteit of antibioticum resistentie en zal daarom geen invloed op de inperking of attenuering, noch op de pathogeniteit of toxiciteit van de bacterie hebben.

De conclusie van de risico-analyse is dat het belang van de bescherming van mens en milieu zich niet verzet tegen de uitvoering van een studie die wordt uitgevoerd zoals beschreven in de aanvraag, in het bijzonder met inachtneming van de in het protocol genoemde in- en exclusiecriteria. Er is voldoende aannemelijk gemaakt dat bij de manier waarop de stammen worden gebruikt, VNP20009 en TAPET-CD voldoende ingeperkt zijn waardoor verspreiding van de bacterie in het milieu en infectie bij mensen in de omgeving van de patiënt zeer onwaarschijnlijk is. Daarnaast is in voldoende mate aangetoond dat in het geval dat de bacterie in het milieu terecht mocht komen ten gevolge van het vrijkomen van de bacteriestam uit de patiënt, de kans op een mogelijk schadelijk effect bij derden vrijwel uitgesloten is. Om deze redenen acht de COGEM het niet noodzakelijk om additionele maatregelen toe te passen ter voorkoming van de verspreiding van de bacterie, zoals isolatieverpleging en speciale ziekenhuishygiënische maatregelen.